DOI:10.11931/guihaia.gxzw202408020

宽筋藤内生真菌 *Colletotrichum queenslandicum* KJT-1 的分离鉴定及其微生物转化研究

张高荣[1]，杨敏婷[1]，陈兰燕[1]，张文秀[1]，杨浪[1]，赖红芳[1]，李俊[2*]，王爱娟[1*]

（1. 广西蚕桑丝绸协同创新中心，广西蚕桑生态学与人工智能重点实验室，化学与生物工程学院，河池学院，广西 河池 546300；2. 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室，化学与药学学院，广西师范大学，广西 桂林 541000）

摘 要：为充分开发宽筋藤(*Tinospora sinensis*)的内生真菌资源，获得对宿主药材具有微生物转化能力的菌株，该文采用组织分离法，结合 ITS 序列分析对分离得到的内生真菌进行鉴定；通过抑菌实验、DPPH 自由基清除实验和液质联用技术对微生物转化前后的提取物的生物活性及化学成分差异进行分析评价。结果表明：(1)从宽筋藤中分离得到了 1 株对宿主药材具有微生物转化能力的内生真菌，并鉴定为 *Colletotrichum queenslandicum*。(2) 微生物转化前的宽筋藤的各提取物对供试菌株均无抑制作用，而微生物转化后的宽筋藤的正丁醇提取物对金黄色葡萄球菌具有抑制作用，其 MBC 值为 31.3 mg·mL^{-1}。(3) 微生物转化后的宽筋藤的粗提物、正丁醇和乙酸乙酯萃取物清除 DPPH 自由基的能力较转化前有所降低，而石油醚萃取物清除 DPPH 自由基的能力较转化前有所提高。(4)从微生物转化前后的宽筋藤正丁醇萃取物中分别识别并鉴定出 33 和 23 个化合物，转化前后其化学成分发生了改变。该研究从宽筋藤中分离并鉴定了一株对宽筋藤药材具有生物转化能力的内生真菌，为宽筋藤的高效利用及生物转化研究提供了一定的理论支持。

关键词：内生真菌，宽筋藤，生物转化，化学成分，生物活性

中图分类号：Q946　　　　**文献标识码**：A

Isolation, identification and microbial transformation of endophytic fungi *Colletotrichum queenslandicum* KJT-1 of *Tinospora sinensis*

ZHANG Gaorong[1], YANG Minting[1], CHEN Lanyan[1], ZHANG Wenxiu[1], YANG Lang[1], LAI Hongfang[1], LI Jun[2*], WANG Aijuan[1*]

(1. *Guangxi Collaborative Innovation Center of Modern Sericulture and Silk*, *Guangxi Key Laboratory of Sericulture Ecology and Applied Intelligent Technology, School of Chemical and Biological Engineering, Hechi University*, Hechi 546300, Guangxi, China; 2. *Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources (Ministry of Education of China), School of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Guangxi Normal University*, Guilin 541004, Guangxi, China)

Abstract： To fully develop the endophytic fungal resources of *Tinospora sinensis* and obtain strains with microbial transformation capabilities for the host medicinal material, this study employed a tissue isolation method and ITS sequence analysis to identify the isolated endophytic fungi and conduct microbial transformation research. The bioactivity and chemical composition differences of the extracts before and after microbial transformation were analyzed and evaluated through antibacterial experiments, DPPH radical scavenging assays,

基金项目：广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2022KY0611，2024KY0630)；国家自然科学基金(216620040)；广西现代蚕桑丝绸协同创新中心基金资助项目(2023GXCSSC8，2023GXCSSC11)；河池学院科研项目(2020XJYB007)；河池学院高层次人才科研项目(2021GCC018)。

第一作者：张高荣（1992—），讲师，主要从事天然药物化学研究，(E-mail) zhanggaorong15@163.com。

*__通信作者__：李俊，教授，博士生导师，主要从事天然产物化学研究，(E-mail) lijun9593@gxnu.edu.cn；王爱娟，讲师，主要从事药物质量分析研究工作，(E-mail) 2020660002@hcnu.edu.cn。

and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) techniques. The results were as follows: (1) An endophytic fungus was isolated and identified as *Colletotrichum queenslandicum* from *Tinospora sinensis*, which demonstrated microbial transformation capabilities towards the host medicinal material. (2) The extracts of *T. sinensis* before microbial transformation had no inhibitory effect on the tested strains. Howeever, after microbial transformation, the *n*-butanol extract of *T. sinensis* had inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, with a minimum bactericidal concentration of 31.3 g·mL^{-1}. (3) The DPPH free radical scavenging ability of crude extract, *n*-butanol and ethyl acetate extract was decreased compared with that before transformation, while the petroleum ether extract exhibited an enhanced scavenging ability compared with that before transformation. (4) A total of 33 and 23 compounds were identified and characterized from the *n*-butanol extracts of *Tinospora sinensis* before and after microbial transformation, respectively, indicating the changes in chemical composition. This study isolated and obtained an endophytic fungus with microbial transformation capabilities of the *T. sinensis*, providing theoretical support for research on its efficient utilization and biotransformation.
Key Words: endophytic fungi, *Tinospora sinensis*, microbial transformation, chemical constituents, biological activity

宽筋藤为防己科青牛胆属植物中华青牛胆（*Tinospora sinensis*）的干燥藤茎，其性寒，味苦，归肝经 (国家中医药管理局《中华本草》委员会，1999；湖南植物志编辑委员会，2000)，广泛分布在广东、广西和云南等省份。文献研究表明，宽筋藤多以其藤茎入药，具有舒筋活络、祛风止痛、补虚、调经等作用 (贾敏如等，2016；刘晓芳等，2023)。宽筋藤中含有多种化学成分，主要包括生物碱、萜类、黄酮类、酚类及其他类等，这些化学成分具有多种生物活性，如抗氧化、抗炎、镇痛、抗风湿性关节炎等 (Jain et al., 2010；薛强等，2014；吴凤荣等，2014；蒋欢等，2017；格桑次仁等，2017；杨光忠等，2019；孙梦盛等，2020；高艳艳等，2022；许广宁等，2024)。

伴随交叉学科及技术的进步，微生物转化这一新兴技术对研究中药新药和开发创新药物具有重大意义。微生物转化主要是利用微生物在生长和代谢过程中产生的酶对底物进行结构修饰的一种化学反应，其本质为酶催化反应，通过分解、转换等方式改变中药材中的活性物质，减毒增效，创造出新的化合物、或转化生成活性更强的衍生物及生成一系列具有生物活性的代谢产物 (关松磊等，2018；谢少朵等，2018；马玉俊等，2024；高元纬等，2024)。Yang 等 (2009) 研究发现光合细菌转化后的槲寄生的转化产物的抗肿瘤活性明显增强。Zhan 等 (2017) 研究利用雅致小克银汉霉对青蒿素进行微生物转化，发现其中一种转化产物的抗疟活性和溶解性比青蒿素更优。曹艺等 (2015) 发现枯草芽孢杆菌能够转化马兜铃酸 A，能够降低药材的毒性。综上说明微生物转化技术不仅能够将中药的传统价值融为一体，更助于提升药效、减低中药材的潜在毒性，有利于促进中药现代化发展。植物内生真菌是指生活在植物组织内部，但并不引起植物产生病害，与植物互利共生，对宿主的适应性更强的真菌。研究表明其能合成与宿主相同或相似的化合物成分，促进宿主植物合成相似的活性成分 (丁常宏等，2013)。内生菌作为重要的微生物资源，利用其进行微生物转化产生活性物质已成为研究热点。谢少朵等 (2018) 研究发现雷公藤内生真菌能对雷公藤粗提物进行转化，产生高效低毒的抗肿瘤产物，具有增效减毒的作用。刘德柱等 (2022) 研究发现内生真菌 Fusarium-C39 生物转化后的滇重楼中的重楼总皂苷、重楼皂苷Ⅰ、Ⅱ和Ⅶ含量显著提高。宽筋藤一直作为民族药使用，目前对其的研究主要集中在提取物及化学成分方面。然而，对于宽筋藤内生菌及其微生物转化的研究尚未报道，其是否能对宿主进行生物转化及转化前后的物质成分及生物活性是否存在差异亦尚未清楚。因此，本研究通过对宽筋藤内生真菌的分离鉴定并利用其对宽筋藤药材进行微生物转化，探讨微生物转化前后宽筋藤的物质变化及生物活性差异，为进一步开发利用宽筋藤及其微生物资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2022 年 5 月采自广西河池市宜州区的 1 株新鲜宽筋藤药材，经河池学院谢彦军老师鉴定为中华青牛胆

(*Tinospora sinensis*)的藤茎，标本存放于河池学院 201 实验室。指示菌株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonasa eruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、链球菌 (*Streptococcus*)由河池学院何海燕教授实验室惠赠，土豆、大米均购于当地超市，宽筋藤药材购自于当地药店。

1.2 培养基种类

PDA 培养基、PDB 培养基、LB 液体培养基、大米培养基 (将 50 g 大米置于 500 mL 锥形瓶中，加水蒸馏水约 80 mL)、宽筋藤药材培养基 (将宽筋藤药材进行粉碎，过 80 目筛。称取 50 g 药材粉末置于 500 mL 锥形瓶中，加蒸馏水约 80 mL)，以上培养基均经高压蒸汽灭菌后使用。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 试剂

1,1-二苯基-2-苦肼基 (DPPH)、氨苄青霉素钠、阿莫西林、氟康唑、二甲基亚砜 (DMSO)、氯化钠、葡萄糖、磷酸二氢钾和氢氧化钠等实验试剂和药品均购自广西依玲医疗器械有限公司，正丁醇、乙酸乙酯、甲醇、石油醚、无水乙醇均为分析纯试剂且购买于西陇科学股份有限公司，蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉和酵母粉均购自北京奥博星生物科技有限责任公司。

1.3.2 仪器

旋转蒸发仪 (购自上海亚荣科技有限公司)、高效液相-质谱联用仪 (购自美国 Waters 公司)、生化培养箱 (购自山东博科生物产业有限公司)、移液枪 (购自德国 Eppendorf 公司)、多功能酶标仪 (购自山东博科生物产业有限公司)。

2 实验方法

2.1 宽筋藤内生真菌 KJT-1 的分离纯化

内生真菌的分离纯化操作参考文献 (谢少朵等，2018) 进行。将新鲜的宽筋藤茎用已消毒的剪刀剪成断，用 75%的乙醇溶液进行浸泡消毒 3 min 后取出，5%次氯酸钠溶液浸泡 30 s，用无菌水进行冲洗 4-5 次，吸水晾干。用已消毒灭菌的解剖刀进行切割，分成合适的小段 (5 mm × 5 mm)，并将其以三角形形状均匀接种于含有氨苄青霉素钠的 PDA 平板培养基上，于 25~28 ℃的生化培养箱中培养至长出菌丝。最后一次冲洗的无菌水涂布于相同处理的 PDA 平板培养基上作为表面消毒对照，培养 5~7 d 无真菌生长即说明表面消毒彻底，说明分离得到的真菌即为植物内生真菌。待接种的茎皮组织培养长出菌丝后，用已消毒的接种环挑取菌丝接种到新鲜 PDA 平板培养基上，在 25~28 ℃培养，之后不断挑取顶端菌丝进一步进行分离纯化，直至出现单一菌落为止。挑取获得的单一菌落的顶端菌丝接种到新的 PDA 平板培养基上，即获得纯化的单一纯菌株 KJT-1，4 ℃保存备用 (谢少朵等，2018)。

2.2 内生真菌 KJT-1 的菌种鉴定

挑取适量的 KJT-1 菌株菌丝体接种到 PDA 平板培养基上，观察其形态特征并记录。挑取适量的 KJT-1 菌株菌丝接种到 PDB 液体培养基中，25~28 ℃条件下摇床培养 3~4 d，离心，转速 1 500 $r \cdot min^{-1}$，收集菌丝体后用 DNA 提取试剂盒提取其 DNA。扩增引物为 ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)，产物纯度检测、测序等工作委托青岛鹏翔生物科技有限公司进行。将基因测序获得的结果与 NCBI 核酸数据库中的数据进行比对，使用 MEGA 7 软件构建其系统发育树，确定其种属 (刘琳玉等，2018)。

2.3 微生物转化发酵培养

微生物转化培养基制备及发酵转化参考文献 (刘姜华，2018；邹海亮等，2019) 进行修改。挑取适量活化好的 KJT-1 菌株菌丝接种至 PDB 培养基中，25~28 ℃条件下摇床培养 3 d 得到种子发酵液。在无菌条件下，吸取已摇匀的 5 mL 种子发酵液分别接种到已灭菌放凉的两种供试培养基(宽筋藤药材培养基和大米培养基) 中，25~28 ℃条件下发酵 28 d。同时，用 5 mL 的无菌水代替种子发酵液的宽筋藤药材培养基作为空白对照，其他处理过程与实验组一致。

2.4 微生物转化前后的宽筋藤药材提取物和 KJT-1 菌株代谢产物制备

宽筋藤药材提取物制备参考文献 (高艳艳等，2022)。将未添加种子发酵液的宽筋藤药材培养基用 1 L 的 70%乙醇连续提取三次，每次 2 h，过滤，然后将所有提取液合并，减压浓缩得到粗提物 (CE-1)。接着以水为溶剂来分散粗提物，依次用 1 L 的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取，最后分别减压浓缩得到石油醚萃取物 (PE-1)、乙酸乙酯萃取物 (EA-1)和正丁醇萃取物 (*n*-BE-1)。微生物转化后的宽筋藤药材提取物制备按照上述步骤操作进行，最后得到微生物转化后的宽筋藤粗提物 (CE-2)、油醚萃取物 (PE-2)、乙酸乙酯萃取物 (EA-2) 和正丁醇萃取物 (*n*-BE-2)。KJT-1 菌株大米培养基发酵产物用 1 L 的 70%乙醇连续提取三次，每次 2 h，过滤，将所有提取液合并，减压浓缩得到 KJT-1 菌株代谢产物。

2.5 微生物转化前后的宽筋藤各提取物的抑菌活性测定

以打孔法测定微生物转化前后的宽筋藤提取物的抑菌圈直径对抑菌活性进行评价 (徐晓梅等，2018)。分别用 DMSO 将微生物转化前后的宽筋藤各提取物 (CE-1、PE-1、EA-1、*n*-BE-1、CE -2、PE-2、EA-2、*n*-BE-2) 配制成 1 g·mL^{-1} 的样品溶液，阳性对照药物氟康唑和阿莫西林分别配成 20 mg·mL^{-1} 和 0.1 mg·mL^{-1}，KJT-1 菌株代谢产物配置成 1 g·mL^{-1} 的样品溶液做空白对照。在无菌条件下，将供试菌株 (金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌、链球菌、绿脓杆菌) 涂布于 LB 培养基平板上，然后等间距放置用样品溶液、空白对照溶液和相应的阳性对照溶液浸泡的 6 mm 直径的小纸片，每个样品设置 3 个重复。随后将其培养皿放置在 37 ℃的培养箱中培养 20 h。使用“十字交叉”方法测量抑菌圈的直径，用抑菌圈直径的平均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 来评估其对 5 种指示菌株的抑制效果。

2.6 微生物转化后的宽筋藤正丁醇萃取物最小杀菌浓度测定

以试管二倍稀释法来确定其最小杀菌浓度 (MBC) (李慕紫等，2017)。取 10 支已灭菌处理的试管并分别编号为 1~10，往试管中分别加入 2 mL 的无菌肉汤培养基。第 1 管中添加以 DMSO 配置的浓度为 1 g·mL^{-1} 的待测样品 2 mL，并充分混合。按照梯度稀释的方法，将样品溶液从第 1 管逐步稀释至第 9 管，稀释后的 1~9 管的浓度分别为 500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95 mg·mL^{-1}。第 10 管则加入生理盐水，作为对照管。接着，分别向 1~10 管中添加 0.1 mL 的菌液，混匀。每管设置三个平行。随后，将所有试管放入 37℃培养箱中，静置培养 20 h。培养结束后，在无菌条件下从每一支试管中的取 0.1 mL 培养液，分别置于 LB 培养基的培养皿上，并使用涂布器将其均匀涂覆。将培养皿置于 37 ℃培养箱中培养 20 h 并观察记录。若某浓度下的培养皿上有菌生长，则记为“＋”，表示无杀菌效果；反之，则记为“－”，表示有杀菌效果。如果观察到培养皿上没有任何菌落生长，指示药物已成功杀灭菌，以无菌生长对应的最低药物稀释浓度作为该样品对受试菌株的 MBC 值。

2.7 微生物转化前后的宽筋藤各萃取物 DPPH 自由基清除实验

DPPH 自由基清除实验参照文献 (王妍惠，2021) 进行。将微生物转化前后的宽筋藤粗提物与各萃取物 (CE-1、PE-1、EA-1、*n*-BE-1、CE-2、PE-2、EA-2、*n*-BE-2) 分别加入无水乙醇稀释 20 倍，60℃超声处理 10 min，备用。用无水乙醇将 50 mg·mL^{-1} 的样品稀释成 1 mg·mL^{-1}、0.5 mg·mL^{-1}、0.1 mg·mL^{-1}、0.05 mg·mL^{-1}、0.01 mg·mL^{-1} 的工作溶液。维生素 C (VC) 作为阳性对照。分别吸取 3 mL 各浓度的样品工作溶液和阳性对照工作溶液与 2 mL DPPH 溶液混合，避光反应 30 min。以无水乙醇作为空白对照，测定 517 nm 处的吸光度并计算 DPPH 自由基清除率，其计算方法参照参考文献 (李火云等，2015；刘亚男等，2023)，计算公式如式 1：

$$\text{DPPH 自由基清除率}=\left[1-\frac{A_2-A_1}{A_0}\right]\times 100\% \quad (1)$$

式中：A_0 是 DPPH 2 mL 和 3 mL 的无水乙醇反应后测定的吸光度；A_1 是 2 mL 无水乙醇与 3 mL 样品溶液反应后测定的吸光度；A_2 是 3 mL 样品溶液 2 mL DPPH 溶液反应后测定的吸光度。

2.8 微生物转化前后的宽筋藤正丁醇萃取物化学成分分析

本研究采用 LC-MS 联用技术在负离子模式下对微生物转化前后的宽筋藤的正丁醇萃取物 (*n*-BE-1、*n*-BE-2) 进行数据采集，得到其总离子流图，通过质谱信息及比对数据库 (NIST23.L) 进行化学成分分析。

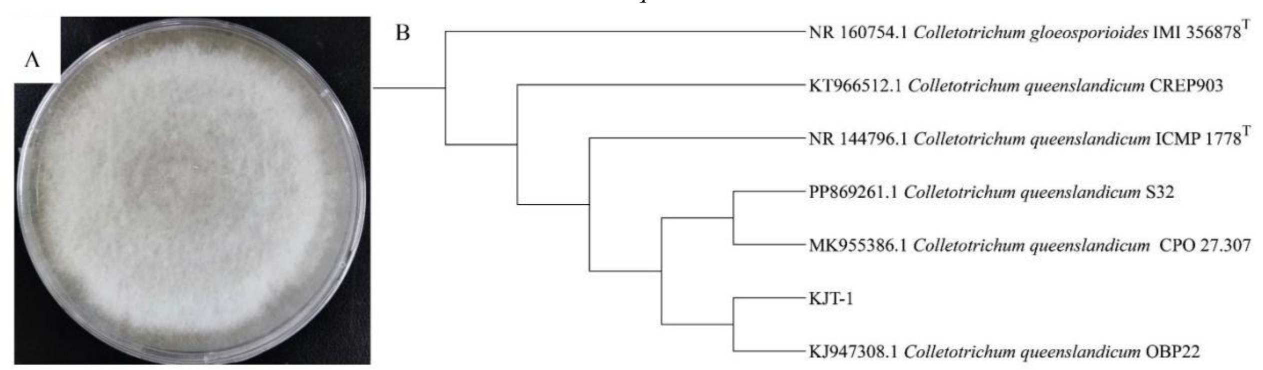
色谱条件：色谱柱为 ACQUITYUPLC-BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)，以 0.1%甲酸水(A)-甲醇(B) 作为流动相进行梯度洗脱 (0～40 min，10%B～100% B)，流速为 1 mL·min^{-1}，柱温 35 ℃，进样量 1 μL，

检测波长设为 254 nm。质谱条件：本实验利用 Waters 系统中的电喷雾离子源(ESI)对样品进行负离子模式下的全扫描，毛细管压 3.0 kV、锥孔压 30 V、锥孔回流流速 50 $L·h^{-1}$、去溶剂气体流速 1 000 $L·h^{-1}$、离子源温度 230 ℃、去溶剂气体温度 300 ℃、每 0.2 s 取一次谱图，扫描范围 *m/z* 50~1 000。采用 UNIFITM 1.9.4 质谱分析软件进行数据采集和分析 (郭宁，2022)。

3 结果与分析

3.1 内生真菌 KJT-1 菌株的菌种鉴定

在微生物的纯化过程中，总共分离得到内生真菌 10 株 (编号 KJT-1－KJT-10)。本研究对分离得到的 10 株内生真菌进行转化研究发现，KJT-1 菌株代谢产物及其转化前各提取物对 5 种指示菌株无抗菌活性，仅其转化后的正丁醇萃取物 (n-BE-2) 对指示菌株金黄色葡萄球菌表现出明显的抗菌活性，其他菌株转化前后的各提取物对 5 种指示菌株的抗菌活性无明显差异，说明 KJT-1 具有较好的转化能力，值得深入研究。另外，KJT-1 菌株的代谢产物转化前后均无抗菌活性，也减少了转化过程的不确定因素对转化结果产生的影响。故以 KJT-1 菌株作为实验菌株并进行鉴定。如图 1：A 所示，KJT-1 菌株在 PDA 平板上生长良好，菌丝白色，质地柔软，表面光滑，容易挑起。基于基因测序结果及经 Blast 比对，得到与其同源性较高的序列信息菌株，利用 MEGA 7 软件和邻位相连法构建系统进化树。所图 1：B 所示，KJT-1 菌株与 *Colletotrichum queenslandicum* OBP22 分在同一簇内，与 *Colletotrichum queenslandicum* OBP22 的序列相似性最高，为 99.67%，故 KJT-1 菌株为 *Colletotrichum queenslandicum*。



A. 真菌形态；**B**. 系统进化树（T 表示模式生物）。

A. Fungal morphology；**B**. Phylogenetic tree (T indicatess model organism).

图 1 KJT-1 菌株的物种鉴定结果

Fig. 1 Results of species identification of KJT-1 strain

3.2 微生物转化前后宽筋藤各提取物的抑菌活性

由表 1 得知，除阳性药外，微生物转化前的宽筋藤各提取物对五种测试菌株均无抑菌作用，并且目前对宽筋藤提取物的抗菌作用研究尚未报道。由表 2 和表 3 得知，微生物转化后的宽筋藤的粗提物、乙酸乙酯与石油醚萃取物对五种测试菌株均无抑制作用，正丁醇萃取物能够抑制金黄色葡萄球菌的生长，其抑菌圈直径为 (9.82 ± 0.2) mm。最低杀菌浓度实验结果表明，微生物转化后的宽筋藤正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌的 MBC 值为 31.3 $mg·mL^{-1}$，而对其他四种测试菌株无抗菌作用，因此未测定其 MBC 值。

表 1 微生物转化前宽筋藤各提取物 (1 $g·mL^{-1}$) 的抑菌圈直径 (mm)

Table 1 Diameter of antibacterial zone of extracts (1 $g·mL^{-1}$) of *Tinospora sinensis* before microbial transformation

名称 Name	微生物菌种 Microbial strain (mm)				
	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	白色念珠菌 *Candida albicans*	绿脓杆菌 *Pseudomonasa eruginosa*	大肠杆菌 *Escherichia coli*	链球菌 *Streptococcus*
CE-1	—	—	—	—	—
PE-1	—	—	—	—	—

EA-1	—	—	—	—	—
n-BE-1	—	—	—	—	—
阳性对照 Positive	32.33±1.65	—	10.30±0.93	15.31±0.70	27.13±6.89
空白对照 (KJT-1 菌株代谢产物) Blank control (Secondary metatolites of KJT-1 strain)	—	—	—	—	—

注：CE-1、PE-1、EA-1 和 *n*-BE-1 分别表示微生物转化前宽筋藤的粗提物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物；－表示未观察到抑菌圈，下同。

Note：CE-1, PE-1, EA-1 and *n*-BE-1 indicates the crude extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract of *Tinospora sinensis* before microbial transformation, respectively; － indicates that no inhibitory zone is observed, the same below.

表 2 微生物转化后宽筋藤各萃取物 (1 g·mL^{-1}) 的抑菌圈直径 (mm)

Table 2 Diameter of antibacterial zone of extracts (1 g·mL^{-1}) of *Tinospora sinensis* before microbial transformation

名称 Name	微生物菌种 Microbial strain (mm)				
	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	白色念珠菌 *Candida albicans*	绿脓杆菌 *Pseudomonasaeruginosa*	大肠杆菌 *Escherichia coli*	链球菌 *Streptococcus*
CE-2					
PE-2	—	—	—	—	—
EA-2	—	—	—	—	—
n-BE-2	9.82±0.2	—	—	—	—
阳性对照 Positive control	22.46±1.13	—	12.68±0.10	16.13±0.33	23.88±0.16
空白对照 (KJT-1 菌株代谢产物) Blank control (Secondary metatolites of KJT-1 strain)	—	—	—	—	—

注：CE-2、PE-2、EA-2 和 n-BE-2 分别表示微生物转化后宽筋藤的粗提物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃物、正丁醇萃取物；—表示未观察到抑菌圈。

Note：CE-2, PE-2, EA-2 and n-BE-2 indicates the crude extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract of *Tinospora sinensis* after microbial transformation, respectively.

表 3 微生物转化后宽筋藤正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌的 MBC 值

Table 3 MBC values of *n*-butanol extract of *Tinospora sinensis* against *Staphylococcus aureus* after microbial transformation

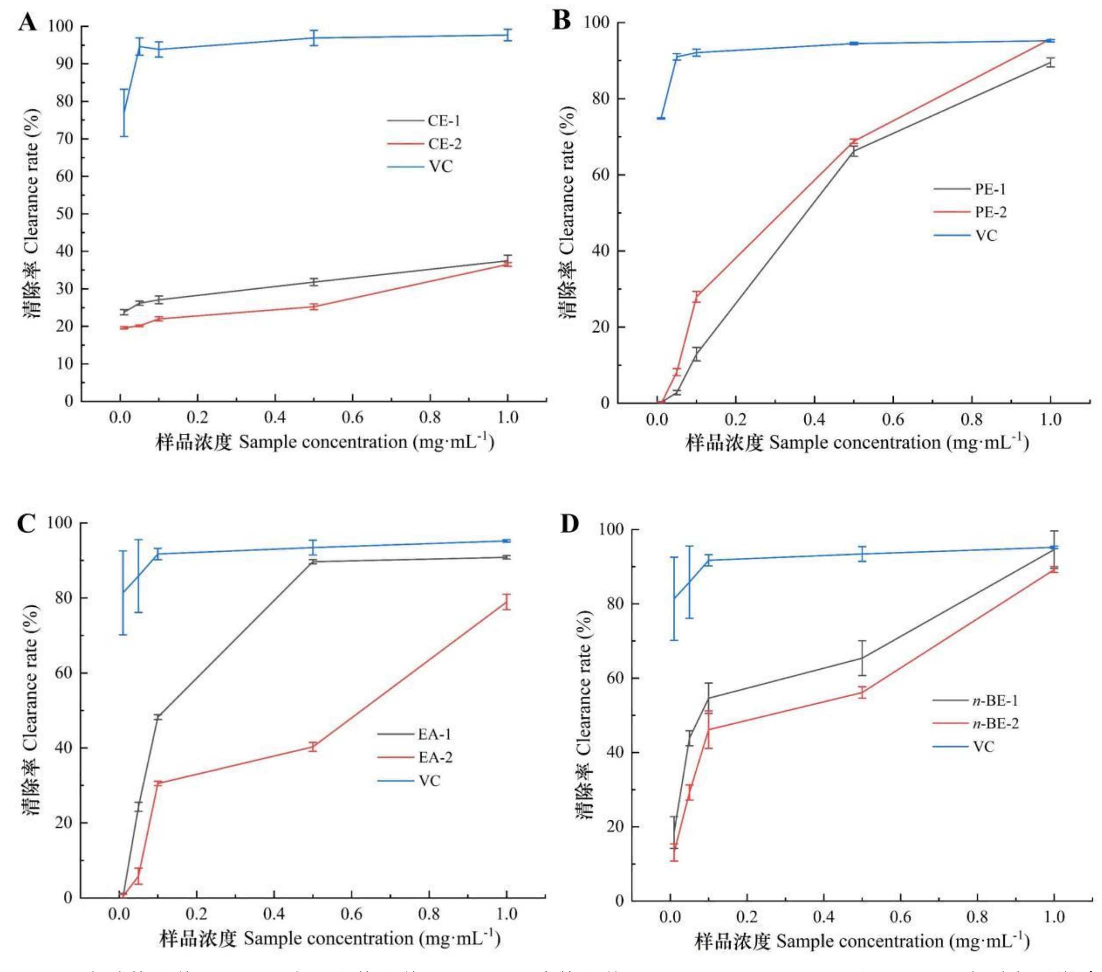
管号 Pipe number	浓度 Concentation (mg·mL^{-1})	平行实验结果 Parallel experimental result		
		1	2	3
1	500	－	－	－
2	250	－	－	－
3	125	－	－	－
4	62.5	－	－	－
5	31.3	－	－	－
6	15.6	＋	＋	＋
7	7.81	＋	＋	＋
8	3.91	＋	＋	＋
9	1.95	＋	＋	＋
10	空白对照 (生理盐水) Blank control (normal saline)	＋	＋	＋

注：－表示没有细菌生长；＋表示有细菌生长。

Note: － indicates no bacterial growth; + indicates bacterial growth.

3.3 微生物转化前后宽筋藤各提取物的 DPPH 自由基清除实验结果

如图 2 所示，转化前后的宽筋藤各提取物均具有一定的清除 DPPH 自由基的能力，其清除能力与浓度呈剂量依赖性。由图 2：A 得知，在 1 mg·mL^{-1} 的浓度下，微生物转化前的宽筋藤粗提物的 DPPH 自由基清除率约为 37.5%，转化后 DPPH 自由基清除率约为 36.58%，相比转化前减少了 0.92%；由图 2：B 得知，在 1 mg·mL^{-1} 的浓度下，转化前宽筋藤石油醚萃取物其清除效率为 88.8%，转化后其清除效率达到了 95.7%，相较于转化前升高了 6.88%；由图 2：C 得知，在 1 mg·mL^{-1} 的浓度下，转化前宽筋藤乙酸乙酯萃取物清除率达到 90.5% 转化后清除率为 78.92%，相较于转化前降低了 11.62%；由图 2：D 得知，在 1 mg·mL^{-1} 的浓度下，转化前宽筋藤正丁醇萃取物清除率达 93.85%，转化后清除率为 89.23%，较转化前的水平降低了 4.62%。综上所述，微生物转化前后的宽筋藤各提取物均具有一定的清除 DPPH 的能力且转化后其清除能力有所改变，说明了微生物转化过程使宽筋藤的提取物的化学成分发生了一定的改变。



A. 粗提物；**B**. 石油醚萃取物；**C**. 乙酸乙酯萃取物；**D**. 正丁醇萃取物。CE-1、PE-1、EA-1 和 *n*-BE-1 分别表示微生物转化前宽筋藤的粗提物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物；CE-2、PE-2、EA-2 和 *n*-BE-2 分别表示微生物转化后宽筋藤的粗提物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃物、正丁醇萃取物；VC 表示阳性对照药维生素 C。

A. crude extract; **B**. petroleum ether extract; **C**. ethyl acetate extract; **D**. *n*-butanol extract. CE-1, PE-1, EA-1 and *n*-BE-1 indicates the crude extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract of *Tinospora sinensis* before microbial transformation, respectively; CE-2, PE-2, EA-2 and *n*-BE-2 indicates the crude extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract of *Tinospora sinensis* after microbial transformation, respectively; VC indicates the positive control Vitamin C.

图 2 微生物转化前后宽筋藤各提取物对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 2 Free radical scavenging rate of each extract of *Tinospora sinensis* before and after microbial transformation on DPPH

3.4 微生物转化前后的宽筋藤正丁醇萃取物化学成分

图 3 和图 4 分别为微生物转化前后宽筋藤正丁醇萃取物的总离子流图。由图 3 和表 4 得知，从微生物转化前的宽筋藤正丁醇萃取物中识别并鉴定出 33 个化合物，包括 1 个黄酮、8 个萜类、3 个苯丙素、4 个酯、7 个酚、2 个甾体、3 个生物碱、3 个脂肪酸类及 2 个有机酸类化合物。由图 4 和表 5 得知，从微生物转化后的宽筋藤正丁醇萃取物中识别鉴定出了 23 个化合物，包括 1 个萜、4 个苯丙素、5 个酚、1 苦木素类、6 个脂肪酸类、1 个酯、2 个甾体、1 个生物碱类化合物。结合上述分析得知，微生物转化前后的宽筋藤正丁醇萃取物的化合物种类及数量有所变化，其抗菌活性的产生可能化学成分变化有关，说明微生物发酵对于物质转化具有一定意义。

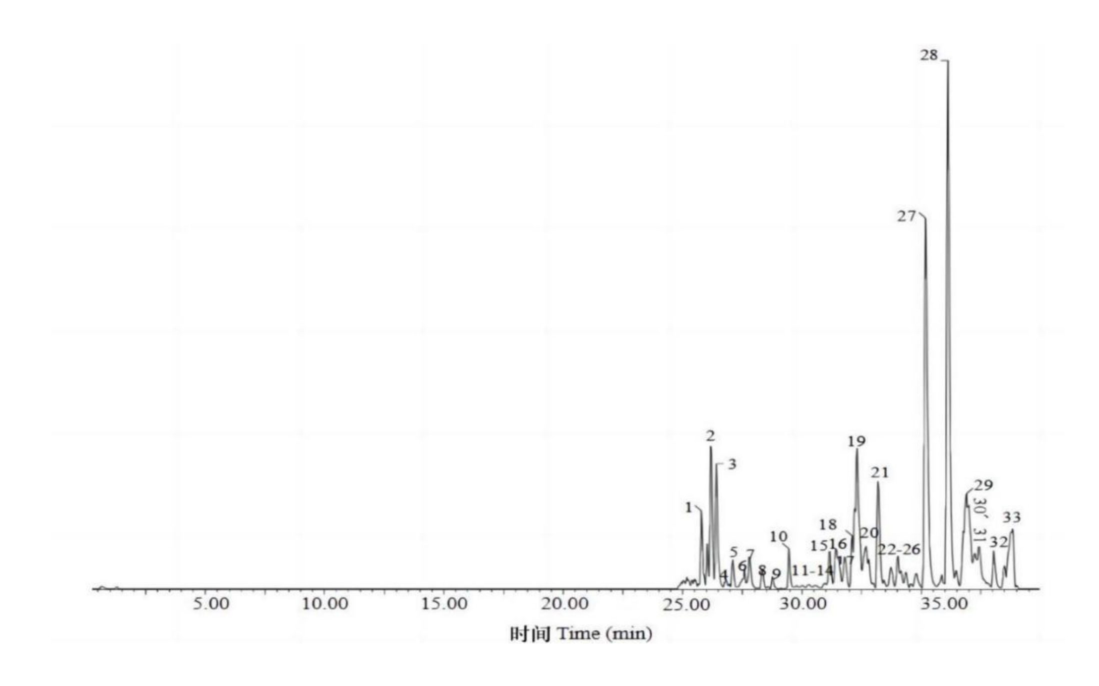


图 3 微生物转化前宽筋藤正丁醇萃取物负离子模式下的总离子流图

Fig. 3 Total ion current plot of ethyl acetate extract after microbial transformation in negative ion mode

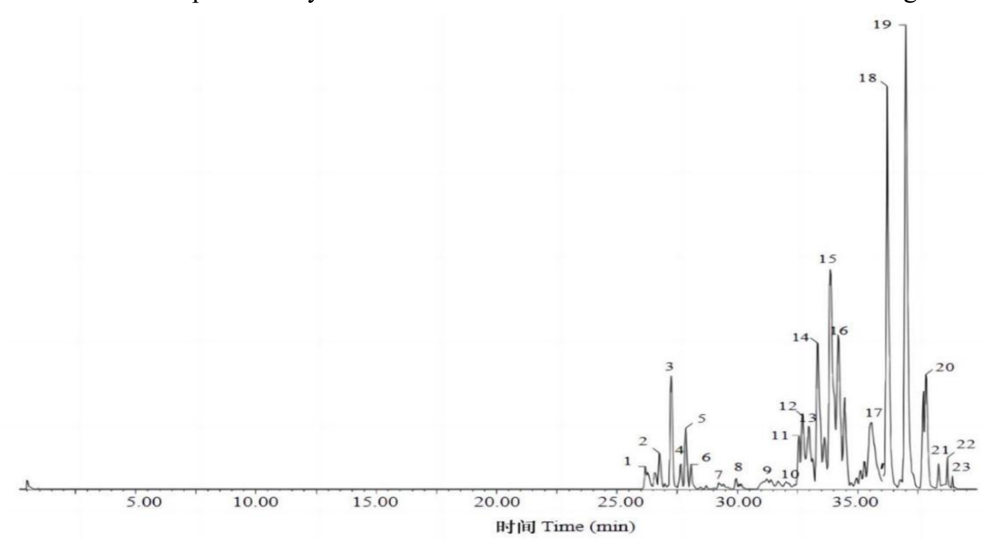


图 4 微生物转化后宽筋藤正丁醇萃取物负离子模式下的总离子流图

Fig.4 Total ion flow plot of *n*-butanol extract after microbial transformation in negative ion mode

表 4 微生物转化前宽筋藤正丁醇萃取物化学成分信息

Table 4 Information on chemical constituents of *n*-butanol extract of *Tinospora sinensis* before microbial transformation

编号 Number	保留时间 Retention time (min)	化学式 Molecular formular	观测的 *m/z* 质量 Observed *m/z* mass	误差值 Error value (×10^6)	化合物 Compound	化合物类别 Compound category
1	24.95	$C_{22}H_{32}O_{13}$	503.174 6	-2.6	肉苁蓉苷 H Cistanoside H	酚类 Phenols
2	25.74	$C_{28}H_{36}O_{13}$	579.208 8	2.8	丁香脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷	苯丙素类 Phenylpropanoids

					Syringaresinol-4-*O*-*β*-D-glucopyranoside	
3	26.23	$C_{24}H_{30}O_{13}$	525.160 6	0.8	牡丹皮苷 E Mudanpioside E	酚类 Phenols
4	26.40	$C_{24}H_{30}O_{12}$	509.170 1	9.4	牡丹皮苷 D Mudanpioside D	酚类 Phenols
5	26.91	$C_{36}H_{36}N_2O_8$	623.240 3	2.4	蒺藜酰胺 A Tribulusamide A	酚类 Phenols
6	27.60	$C_{16}H_{20}O_6$	307.120 4	9.1	九里香甲素 Isomexoticin	苯丙素类 Phenylpropanoids
7	27.77	$C_{18}H_{34}O_5$	329.234 7	7.6	三棱酸 Sanleng acid	酸类 Acid
8	28.36	$C_{21}H_{28}O_6$	375.180 3	0.3	苦木内酯 I Nigakilactone I	萜类 Terpenoids
9	28.78	$C_{32}H_{36}O_{12}$	611.619 2	-0.7	绵马酸 ABA Trisalbaspidin ABA	酚类 Phenols
10	29.47	$C_{22}H_{24}O_{10}$	447.131 6	6.9	(2*S*)-5,7-二羟基-6-甲氧基黄烷酮-7-*O*-*β*-D-吡喃葡糖苷 (2*S*)-5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavanone-7-*O*-*β*-D-glucopyranoside	黄酮类 Flavonoids
11	29.59	$C_{17}H_{26}O_4$	293.174 1	-2.1	姜辣素 (6-姜酚) 6-Gingerol	酚类 Phenols
12	30.29	$C_{21}H_{26}O_6$	373.167 3	7.5	刚果荜澄茄脂 Aschatin	酚类 Phenols
13	30.42	$C_{14}H_{21}NO_4$	267.148 2	4.2	党参碱 Codonopsine	生物碱 Alkaloid
14	30.65	$C_{18}H_{34}O_4$	313.237 0	-0.9	癸二酸二丁酯 Dibutyl sebacate	酯类 Esters
15	31.27	$C_{18}H_{26}O_4$	308.197 3	-1.3	9,16-二羰基-10,12, 14-三烯-十八碳酸 9,16-dioxo-10,12,14-octadeca-trienoic acid	脂肪酸类 Fatty acid
16	31.46	$C_{23}H_{26}N_2O_5$	409.180 2	10.6	伪马钱子碱 Pseudostrychnine	生物碱 Alkaloid
17	31.69	$C_{28}H_{38}O_7$	486.262 9	2.3	Ergosta-2,24-dien-26-oicacid	甾体 Steroid
18	32.40	$C_{24}H_{40}O_{10}$	487.252 1	-3.3	紫菀酮苷 C Shionoside C	萜类 Terpenoids
19	32.63	$C_{36}H_{40}N_2O_6$	595.280 2	0	蝙蝠葛新林碱 Guatteguamerine	生物碱 Alkaloid
20	32.68	$C_{18}H_{30}O_3$	493.337 7	-3.9	(*E*,*E*)-9-Oxooctadeca-10,12-dienoic acid	脂肪酸类 Fatty acid
21	32.72	$C_{30}H_{46}O_4$	571.289 5	-1.1	Coronalolic acid	萜类 Terpenoids
22	33.74	$C_{32}H_{44}O_9$	500.342 7	-8.8	灵芝酸 H Ganoderic acid H	萜类 Terpenoids
23	34.36	$C_{31}H_{46}O_5$	511.342 0	-1.7	茯苓新酸 A Poricoic acid A	萜类 Terpenoids
24	34.53	$C_{18}H_{32}O_3$	297.242 1	-1.0	(+) Coronaric acid	脂肪酸类 Fatty acid

25	34.87	$C_{30}H_{48}O_3$	455.350 6	-2.9	桦木酸 Betulinic acid	萜类 Terpenoids
26	36.11	$C_{16}H_{32}O_2$	255.232 9	4.3	十五烷酸甲酯 Methyl pentadecanoate	酯类 Esters
27	36.88	$C_{32}H_{50}O_4$	497.364 3	3.6	11-去氧-23-乙酰泽泻醇 B 11-Deoxy-alisol B 23-acetate	甾体 Steroid
28	37.46	$C_{17}H_{34}O_2$	269.250 2	10.0	14-甲基-十六烷酸 14-Methylhexadecanoic acid	脂肪酸类 Fatty acid
29	37.55	$C_{19}H_{36}O_2$	295.265 2	7.1	十八碳烯酸甲酯 Trans-11-octadecenoic acid methyl ester	酯类 Esters
30	38.03	$C_{32}H_{52}O_6$	531.370 1	3.9	23-乙酰泽泻醇 C 24-Alisol C 23-acetate	萜类 Terpenoids
31	38.60	$C_{24}H_{30}O_5$	397.200 6	-0.6	Samarcandone	苯丙素类 Phenylpropanoids
32	38.61	$C_{19}H_{38}O_2$	297.280 6	6.1	硬脂酸甲酯 Methyl stearate	酯类 Esters
33	38.81	$C_{36}H_{60}O_8$	619.422 8	3.8	人参皂苷 Rh4 Ginsenoside Rh4	萜类 Terpenoids

表 5 微生物转化后宽筋藤正丁醇萃取物主要化学成分信息

Table 5 Information on chemical constituents of *n*-butanol extract of *Tinospora sinensis* after microbial transformation

编号 Number	保留时间 Retention time (min)	化学式 Molecular formular	观测的 *m/z* 质量 Observed *m/z* mass	误差值 Error value (×10[6])	化合物 Compound	化合物类别 Compound category
1	26.21	$C_{22}H_{32}O_{13}$	503.177 3	2.8	肉苁蓉苷 H Cistanoside H	酚类 Phenols
2	26.78	$C_{26}H_{34}O_{11}$	521.201 6	-0.2	鸦胆子素 A Bruceine A	苦木素类 Bruceine
3	27.11	$C_{26}H_{32}O_{11}$	520.194 2	-0.6	(+)-松脂醇-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷 Pinoresinol-*O*-*β*-D-glucopyranoside	苯丙素类 Phenylpropanoids
4	27.59	$C_9H_{16}O_4$	187.098 2	9.1	杜仲醇 Eucommiol	萜类 Terpenoids
5	27.91	$C_{28}H_{36}O_{13}$	579.207 5	0.5	丁香脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷 Syringaresinol-4-*O*-*β*-D-glucopyranoside	苯丙素类 Phenylpropanoids
6	28.08	$C_{18}H_{19}NO_4$	312.123 6	1.9	*N*-顺式阿魏酰基酪胺 *N*-cis-feruloyltyramine	生物碱 Alkaloid
7	29.23	$C_{16}H_{20}O_6$	307.118 9	4.2	九里香甲素 Isomexoticin	苯丙素类 Phenylpropanoids
8	29.96	$C_{21}H_{28}O_6$	375.180 4	0.5	苦木内酯 I Nigakilactone I	萜类 Terpenoids
9	30.31	$C_{32}H_{36}O_{12}$	611.211 7	-0.9	绵马酸 ABA Trisalbaspidin ABA	酚类 Phenols
10	31.14	$C_{17}H_{26}O_4$	293.176 4	5.8	姜辣素 (6-姜酚) 6-Gingerol	酚类 Phenols

11	32.72	$C_{18}H_{30}O_4$	309.207 8	5.8	9,16-二羰基-10,12, 14-三烯-十八碳酸 9,16-Dioxo-10,12,14-octadeca-trienoic acid	脂肪酸类 Fatty acid
12	32.98	$C_{28}H_{38}O_7$	486.261 9	0.2	Ergosta-2,24-dien-26-oicacid	甾体 Steroid
13	33.63	$C_{18}H_{32}O_3$	295.228 8	7.1	Coronaric acid	酸类 Acid
14	33.81	$C_{18}H_{30}O_3$	293.213 0	6.4	(*E*,*E*)-9-Oxooctadeca-10,12-dienoic acid	脂肪酸类 Fatty acid
15	34.60	$C_{18}H_{30}O_3$	294.220 6	3.7	蓖麻油酸 Ricinoleic acid	脂肪酸类 Fatty acid
16	35.57	$C_{20}H_{24}O_3$	311.164 2	0.3	益智酮甲 Yakuchinone-A	酚类 Phenols
17	36.23	$C_{18}H_{30}O_2$	277.217 1	3.2	亚麻酸 Linolenic acid	脂肪酸类 Fatty acid
18	36.80	$C_{20}H_{24}O_3$	311.162 5	-5.1	十六碳酸烯酸 2-Hexadecenoic acid	脂肪酸类 Fatty acid
19	37.74	$C_{21}H_{24}O_5$	356.163 5	3.1	(-)-白玉兰亭 B(-)-Denudatin B	苯丙素类 Phenylpropanoids
20	38.37	$C_{21}H_{24}O_{11}$	453.139 4	0.4	仙茅苷 B Curculigoside B	酚类 Phenols
21	38.37	$C_{17}H_{34}O_2$	269.248 8	4.8	14-甲基-十六烷酸 14-Methylhexadecanoic acid	脂肪酸类 Fatty acid
22	38.73	$C_{18}H_{36}O_2$	283.163 2	-3.2	十七烷酸甲酯 Methyl heptadecanoate	酯类 Esters
23	38.75	C21H26O3	325.179 4	-1.2	Pregna-4,16-diene-3,12,20-trione	甾体 Steroid

4 讨论与结论

微生物具有强大的分解和转化物质的能力，其本质为酶催化反应，利用微生物转化技术能够产生结构多样且具有生物活性的代谢产物。赖晓微等 (2024) 研究表明真菌发酵可以通过糖基化、羟基化、甲基化、氧化、还原、水解等多种化学反应使黄酮、生物碱、萜类、苯丙素等多种类别物质发生改变，从而形成多种代谢产物。本文利用宽筋藤内生真菌 KJT-1 (*Colletotrichum queenslandicum* KJT-1)对宿主药材进行生物转化，其抗菌研究结果表明内生真菌 KJT-1 的发酵产物和转化前的宽筋藤各提取物对 5 种供试菌株均无抑制作用，而生物转化后的正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌产生了明显的抑制作用且生物转化前后的正丁醇萃取物的化合物种类和数量也明显改变，特别是萜类物质的变化较为明显，说明内生真菌确实对宽筋藤的物质成分进行了转化，并产生了具有生物活性的物质成分。*Colletotrichum queenslandicum* 属于炭疽菌属复合种 (*Colletotrichum gloeosporioides* species complex)中的一种常见真菌，其也能产生某些代谢物直接或间接抑制细菌或真菌的生长。从蒙古蒿中分离得到的内生真菌胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 的次级代谢产物 Collector acid 不仅可以抑制细菌，也抑制真菌的生长 (王帆等，2016)。但本文研究结果显示候选菌株的代谢产物对指示菌株无明显抑制作用，其原因可能与培养基的种类及其他因素有关，从而影响该菌株的代谢产物。研究也证实不同的培养基对微生物的代谢产物也存在显著影响 (金嘉悦等，2023)。

宽筋藤中含有多种化学成分，如萜类、生物碱类、苯丙素类、黄酮类、甾体类和酚类等 (高艳艳等，2022；刘晓芳等，2023)，本研究结果与其一致。另外，研究表明黄酮类化合物不仅具有多种生物活性，还是一种常见的抗氧化剂，其抗氧化机制主要是通过清除自由基并抑制自由基的生成 (涂保，2016)。本研究结果表明转化前后的宽筋藤各提取物均具有一定的清除 DPPH 自由基的能力，其清除能力与浓度呈剂量依赖性。微生物转化后宽筋藤的粗提物、乙酸乙酯和正丁醇萃取物的清除 DPPH 自由基能力有所下降，而石油醚萃取物清除 DPPH 自由基能力有所升高，升高了 6.88%，转化前后其 DPPH 自由基清除能力的改变，

推测可能与其提取物中的黄酮类等化合物的种类和含量的变化有关。针对转化前后抗菌活性及清除 DPPH 自由基能力的改变的结果，推测是由微生物转化引起的物质种类或含量发生了明显变化引起的，化学成分分析结果也表明转化前后的正丁醇萃取物中的生物碱类、萜类物质变化较为明显，进一步说明内生真菌确实对宿主物质成分进行了转化。研究表明，姜辣素类成分具有广谱的抗菌活性 (刘伟等，2015；Lee et al., 2018；鲁萌萌等，2021)，如 6-姜酚能够大肠杆菌的生长 (黎晓菊等，2022)。在本实验中，化学成分分析表明转化前后的正丁醇萃取物中均存在 6-姜酚，转化前无抗菌活性，但转化后具有明显的抗菌活性，推测可能是生物转化引起了抗菌物质的含量增加或生成了新的抗菌物质，并且转化后新增了生物碱类物质 *N*-顺式阿魏酰基酪胺和萜类物质杜仲醇，进一步证实了内生真菌确实对宿主物质成分进行了转化。郑元坤 (2021)研究报道生物碱类物质 *N*-顺式阿魏酰基酪胺具有抑制 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞的 NO 的释放具有抑制作用；同样，Li 等 (2011) 研究表明杜仲醇属于环烯醚萜，也是杜仲的主要成分类别，其能促进肉芽形成及胶原蛋白的合成，但目前对 *N*-顺式阿魏酰基酪胺和杜仲醇的其他活性尚未报道。因此，说明转化前后活性的变化与其化学成分存在一定的关联，但其具体情况还得进一步验证。然而，本研究还存在一定的欠缺，如未对微生物转化后的活性部位进行系统的分离纯化，挖掘并鉴定其主要活性物质；未对微生物转化的机制进行探讨，导致其物质转化机制不明确；未从基因组(簇)角度探讨候选菌株有无产抗菌代谢产物的能力等。因此，本研究下一步拟计划对转化的活性部位化学成分进行系统的分离鉴定、药理活性验证、微生物转化及基因簇调控代谢产物的机制研究等工作。总之，本研究获得了一株对宽筋藤药材具有微生物转化能力的内生真菌(*Colletotrichum queenslandicum* KJT-1)，其能够将宿主的物质成分转化为具有抗菌和抗氧化活性的活性物质，一定程度上为微生物转化和发现先导化合物提供了理论基础，也为宽筋藤及其内生真菌的资源开发利用提供了一定的理论依据。

参考文献：

CAO Y, TAN ZJ, XIA BH, et al., 2015. Research on biological detoxification of Chinese medicine containing aristolochic acid A by ten microorganisms [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 40(10): 1939-1944. [曹艺，谭周进，夏伯候，等，2015. 10 种微生物对含马兜铃酸 A 中药材的生物减毒研究 [J]. 中国中药杂志，40(10)：1939-1944.]

DAWIDOWICZ AL, MAŁGORZATA O, 2014. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components [J]. Natural Product Research, 28(22): 1952-1963.

DING CH, DU XW, XU Y, 2013. Progress of study on function of endophytic fungi from medicinal plants [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 41(3): 165-171. [丁常宏，都晓伟，徐莹，2013. 药用植物内生真菌的功能研究进展 [J]. 中医药学报，41(3)：165-171.]

Editorial board of flora of Hunan, 2000. Flora of Hunan [M]. Hunan Scientific and Technical Publishers: 768-769. [湖南植物志编辑委员会，2000. 湖南植物志 [M]. 湖南科学技术出版社：768-769.]

GAO YW, 2024. Studies on the microbial conversion of *Cepharanthine* and the secondary metabolites produced by related strain [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine: 1-48. [高元纬，2024. 千金藤素的微生物转化及相关菌株的次级代谢产物研究 [D]. 南京：南京医科大学：1-48.]

GAO YY, GUO FX, GUO SB, et al., 2022. Study on chemical constituents from chloroform and *n*-butanol fractions of *Tinosporae sinenisis* (Lour.) Merr [J]. Natural Products Research Development, 34(8): 1325-1331. [高艳艳，郭凤霞，郭少波，等，2022. 宽筋藤氯仿和正丁醇部位化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发，34(8)：1325-1331.]

GESANG CR, WEI YF, BAI WT, et al., 2017. Pharmacological actions of tibetan medicine caulis *Tinosporae sinensis* against collagen-induced rheumatoid arthritis in rats [J]. Traditional Chinese Drug Research&Clinical Pharmacology, 28(3): 327-331. [格桑次仁，韦益飞，白文婷，等，2017. 藏药宽筋藤抗胶原诱导大鼠类风湿性关节炎的药理作用研究 [J]. 中药新药与临床药理，28(3)：327-331.]

GUAN SL, WU YX, SUN H, et al., 2018. Application of microbial transformation technology in the development of Chinese medicine [J]. Microbiology China, 45(4): 900-906. [关松磊，吴雅馨，孙赫，等，2018. 微生物转化技术在中药开发中的应用进展 [J]. 微生物学通报，45(4)：900-906.]

GUO N, 2022. LC-MS analysis of aristolochic acids in *Aristolochia cinnabarina* [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine. [郭宁，2022. 马兜铃科药材朱砂莲中马兜铃酸类物质的 LC-MS 分析 [D]. 济南：山东中医药大学.]

HAN F, LEE IS, 2016. Microbial transformation of bavachin by *Absidia coerulea* [J]. Phytochemisty Letters, 18: 136-139.

JAIN S, SHERLEKAR B, BARIK R, et al., 2010. Evaluation of antioxidant potential of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis* [J]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 1(11): 122-128.

JIA MR, ZHANG Y. 2016. Dictionary of Chinese ethnic medicine [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press: 826-827. [贾敏如，张艺，2016. 中国民族药辞典 [M]. 北京：中国医药科技出版社：826-827.]

JIANG H, 2017. Studies on the chemical constitutents of the stem of *Tinospora sinensis* and their bioactivities [D]. Guilin: Guangxi Normal University. [蒋欢，2017. 中华青牛胆化学成分及生物活性的研究 [D]. 桂林：广西师范大学：1-50.]

JIN JY, FANG MS, YIN KB, JIANG MG, WANG YB, et al., 2023. Research progress of secondary metabolites of marine fungi by OSMAC strategy [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 48(5): 481-491. [金嘉悦，方淼森，尹凯波，姜明国，王一兵，2023. OSMAC 策略探索海洋真菌次生代谢产物的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志，48(5)：481-491.]

LAI XW, DENG KZ, LUO MT, et al., 2024. Research progress on transformation and application of chemical components of traditional Chinese medicine by fungal fermentation [J]. China Brewing, 43(6): 21-26. [赖晓微，邓可众，罗梦甜，等，2024. 真菌发酵对中药化学成分的转化及应用研究进展 [J]. 中国酿造，43(6)：21-26.]

LEE JH, KIM YG, CHOI P, et al., 2018. Antibiofilm and antivirulence activities of 6-gingerol and 6-shogaol against *Candida albicans* due to hyphal inhibition [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8: 299.

LI HY, WAN YP, ZENG X, et al., 2015. Study on the anti-aging effects of rice-protein polypeptides [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 6: 37-40. [李火云，万岳鹏，曾茜，等，2015. 大米多肽抗衰老功效研究 [J]. 香料香精化妆品，6：37-40.]

LI MZ, 2017. Study on bioactivity of *Eletherine americana* extracts and its application in food and cosmetic [D]. Yunfu: Guangdong Pharmacitical University. [李慕紫，2017. 红葱提取物生物活性研究及其在食品化妆品中的应用 [D]. 云浮：广东药科大学.]

LIU DZ, CHEN YY, ZHANG M, et al., 2022. Study on biotransformation of endophytic fungus to enhance saponins content and antitumour activity of *Paridis Rhizoma* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 53(14): 4486-4492. [刘德柱，陈艺扬，张蒙，等，2022. 内生真菌生物转化提高滇重楼皂苷含量及抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药，53(14)：4486-4492.]

LIU JH, 2018. Production of genistein from sophoricoside by microbial transformation [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology. [刘姜华，2018. 微生物转化槐角苷制备染料木素的研究 [D]. 杭州：浙江工业大学]

LIU LY, NURAN B, XIE QX, et al., 2024. Isolation, Identification and antioxidant activity of endophytic fungi from *Berberis atrocarpa* [J]. Molecular Plant Breeding: 1-16[2025-01-12]. https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240530.1320.004. [刘琳玉，努兰·拜都拉，谢秋贤，等，2024. 黑果小檗内生真菌的分离鉴定及抗氧化活性 [J]. 分子植物育种：1-16[2025-01-12]. https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.

20240530.1320.004.]

LIU XF, SHI JL, GU BJ. et al., 2023. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Tinospora sinensis* and prediction analysis on quality markers (Q-Marker) [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 41(7): 156-165. [刘晓芳，史俊豪，古宝浚，等，2023. 宽筋藤化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊，41(7)：156-165.]

LI XJ, TUO CJ, HUANG ZP, et al., 2022. Study on the antibacterial activity of six gingeroloids from *Zingiber officinale*. Natural Product Research and Development, 34(2): 220-225. [黎晓菊，庹呈杰，黄之镨，等，2022. 生姜中 6 个姜辣素类成分的抗菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，34(2)：220-225.]

LIU W, ZHAO J, CHENG D, et al., 2015. Antibacterial mechanism of gingerols [J]. Modern Food Science and Technology, 31(11): 92-100. [刘伟，赵婧，陈冬，等，2015. 姜酚的抑菌机制研究 [J]. 现代食品科技，31(11)：92-100.]

LI Y, ZHAO Y, YANG GP, et al., 2011. Crystal structure and characterization of iridoid related compound isoeucommiol [J]. Journal of Chemical Crystallography, 41(2): 163-166.

LIUYN, WEN YL, CHEN XW, et al., 2023. Essential oil components and their antioxidant and antibacterial activities in different of *Citrus aurantium* var. *amara* [J]. Guihaia, 43(6): 1163-1172. [刘亚男，文雅丽，陈霞蔚，等，2023. 苦橙不同部位挥发油成分及抗氧化与抗菌活性分析 [J]. 广西植物，43(6)：1163-1172.]

LU MM, LI WR, ZHOU SL, et al., 2021. Chemical component and antibacterial activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil [J]. Microbiology China, 48(4): 1121-1129. [鲁萌萌，李文茹，周少璐，等，2021. 生姜精油化学成分及其抗菌活性 [J]. 微生物学通报，48(4)：1121-1129.]

MA YJ, LI X, LI J, et al., 2024. Microbial fermentation of traditional Chinese medicine and its research progress [J]. Tibet Journal of Agricultural Sciences, 46 (1): 107-112. [马玉俊，李翔，李菁，等，2024. 中药微生物发酵及其研究进展 [J]. 西藏农业科技，46 (1)：107-112.]

State Administration of Traditional Chinese medicine “Chinese Materia Medica” Committee, 1999. Chinese Materia Medica: Vol. 3[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press: 393-394. [国家中医药管理局《中华本草》委员会，1999. 中华本草：第三册[M]. 上海：上海科学技术出版社：393-394.]

SUN MS, WEI YF, HE K, 2020. Effects of effective part of *Tinospora sinensis* on hippocampus proteomics of AD rats induced by beta-am-yloid protein and D-galactose [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 55(1): 19-25. [孙梦盛，韦益飞，何堃，等，2020. 宽筋藤有效部位对 D-半乳糖联合 $A\beta_{25\sim35}$ 所致 AD 大鼠海马蛋白组学的影响 [J]. 中国药学杂志，55(1)：19-25.]

TU B, 2016. Research on biological activities and structure-activity relationship of flavonoids [D]. Huangshi: Hubei Normal University. [涂保，2016. 黄酮类化合物生物效应及构效关系研究 [D]. 黄石：湖北师范大学.]

WANG F, 2016. Isolation, identification of endophytic fungi from six kinds of Chinese herbal medicine and their bioactivities [D]. Lanzhou: Lanzhou University of technology. [王帆，2016. 六种中药材内生真菌的分离鉴定及其发酵产物生物活性的研究 [D]. 兰州：兰州理工大学.]

WANG YH, 2021. Extraction, purification and antioxidant activity of polyphenol from *Red Raspberry* leaves [D]. Jinzhou: Bohai University. [王妍惠，2021. 红树莓叶多酚提取纯化及其抗氧化活性研究 [D]. 锦州：渤海大学.]

WU FR, ZENG CY, DAI WB, 2014. Pharmacological effects of *Tinospora sinensis* and research progress in its clinical application [J]. China Licensed Pharmacist, 11(12): 37-40. [吴凤荣，曾聪彦，戴卫波，2014. 宽筋藤的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国执业药师，11(12)：37-40.]

XIE SD, CHEN XD, WANG H, et al., 2018. Isolation and bioactivity studies of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* Hook.f. [J]. Microbiology China, 45(2): 413-419. [谢少朵，陈向东，汪辉，等，2018. 雷公藤内生真菌的分离鉴定及活性研究 [J]. 微生物学通报，45(2)：413-419.]

XUE Q, LUO Y, XU XL, 2014. Experimental study of the anti-inflamentory effect of Kuan Jin Teng extract on mice [J]. Youjiang Medical Journal, 42(3): 285-287. [薛强，罗莹，许小林，2014. 宽筋藤提取物对小鼠抗炎作用的实验研究 [J]. 右江医学，42(3)：285-287.]

XU GN, CAO SQ, HE JY, et al., 2024. The quality of caulis *Tinosporae sinensis* from different origins [J]. Traditional Chinese Medicine Rehabilitation, 1(2): 14-18. [许广宁，曹斯琼，何嘉莹，等，2024. 不同产地宽筋藤药材质量研究 [J]. 中医康复, 1(2)：14-18.]

XU XM, LI MZ, HUANG JR, et al., 2018. Antibacterial activity study of different polar extractings of *Eleutherine americana* [J]. Natural Product Research and Development, 30(9): 1621-1626. [徐晓梅，李慕紫，黄建蓉，等，2018. 红葱不同极性提取物抑菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，30(9)：1621-1626.]

YANG GE, CHEN B, ZHANG ZM, et al., 2009. Cytotoxic activities of extracts and compounds from *Viscum coloratum* and its transformation products by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 152(3): 353-365.

YANG GZ, LI QQ, XU XS, et al., 2019. Study on the chemical constituents of Tibetan medicine *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr. [J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition), 38(4): 547-550. [杨光忠，李庆庆，徐晓诗，等，2019. 藏药宽筋藤化学成分的研究 [J]. 中南民族大学学报(自然科学版)，38(4)：547-550.]

ZHAN YL, WU YS, XU FF, et al., 2017. A novel dihydroxylated derivative of artemisinin from microbial transformation [J]. Fitoterapia, 120: 93-97.

ZHENG YK, 2021. Study on the chemical constituents and anti-inflammatory activity of *Piper puberulum* [D]. Guilin: Guangxi Normal University. [郑元坤，2021. 毛蒟化学成分与抗炎活性的研究 [D]. 桂林：广西师范大学.]

ZOU HL, 2019. Chemical composition and biological activities of extracts of *Sabia parviflora* fermented by edible and medicinal fungi under solid-state cultivation [D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology. [邹海亮，2019. 食药用真菌固体发酵小花清风藤提取物成分分析及其生物学活性研究 [D]. 武汉：华中科技大学.]